Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Frommhold

Untersuchungen an Erythrozyten nach Schädigung mit 1-Bromomerkuri-2-hydroxypropan (BMHP)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingrid Blendinger
aus Mülheim/Ruhr

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Frommhold

Untersuchungen an Erythrozyten nach Schädigung mit 1-Bromomerkuri-2-hydroxypropan (BMHP)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ingrid Blendinger
aus Mülheim/Ruhr

1969

Dekan: Professor Dr. med. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. U. Feine
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Frommhold

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL	4
III. METHODIK	5
IV. ERGEBNISSE	
1. Waschversuche	8
2. Bestimmung der Erythrozytenlebenszeit ...	9
3. Verlauf der Oberflächenaktivität über Leber und Milz	14
V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	
1. Vergleich der eigenen Untersuchungen mit Angaben der Literatur über Waschversuche an Erythrozyten	17
2. Mechanismus der Schädigung der Erythrozyten durch BMHP	19
3. Einfluß des BMHP auf die Erythrozytenlebenszeit	22
4. Interpretation des Aktivitätsverlaufes über Leber und Milz und Hinweise für die Milzszintigraphie	23
VI. ZUSAMMENFASSUNG	25
VII. TABELLEN UND ABBILDUNGEN	27
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	38

I. EINLEITUNG

Die Szintigraphie der Milz gehört mit zu den jüngsten Untersuchungsmethoden des Isotopenlabors. Sie hat sich jedoch in der kurzen Zeit seit ihrer Erstbeschreibung (1960) gut bewährt, insbesondere bei einer Reihe von hämatologischen Erkrankungen und bei der Differentialdiagnose der Tumoren des linken Oberbauches. Allerdings ließ sich bisher noch keine Substanz finden, die - ähnlich dem Jod in der Schilddrüse - selektiv in der Milz gespeichert wird. Daher nutzt man die Fähigkeit des Organs zur Sequestration geschädigter Erythrozyten, um auf diesem Umweg die Anreicherung eines radioaktiven Nuklids zu erreichen und so die szintigraphische Darstellung zu ermöglichen. GRAY und STERLING (8) fanden, daß das Chromisotop Cr^{51} eine relativ feste Bindung mit den roten Blutkörperchen eingeht und sich daher zu ihrer Markierung gut eignet. Angewandt wurde diese Erkenntnis zunächst von JOHNSON u. Mitarb. (21), die die Erythrozyten mit Cr^{51} markierten und durch Sensibilisierung schädigten, dann von WINKELMANN u. Mitarb. (38), die eine thermische Alteration anwandten.

Die bisher einfachste Methode, nämlich eine Erythrozytenmarkierung und -schädigung in einem Arbeitsgang, schilderten WAGNER u. Mitarb. (36). Sie benutzten als Substanz eine radioaktive organische Quecksilberverbindung, das 1-Mercuri-2-hydroxypropan (MHP) mit dem Isotop Hg^{197}, die sie nach einer Vorschrift von SAND und HOFMANN (30) aus dem Jahre 1900 synthetisierten.

In den folgenden Jahren berichteten mehrere Autoren (35, 3, 6, 13, 14, 15, 5, 33) über ihre Erfahrungen mit 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) bei der Milzszintigraphie. Als Vorteil wird vor allem immer die Zeitersparnis angeführt: Die Vorbereitung für die Milzszintigraphie, also die Markierung und Schädigung der Erythrozyten in vitro, wird von

etwa 90 Minuten bei der Cr^{51}-Markierung und Wärmealteration auf 5 Minuten bei der BMHP-Methode verkürzt. Außerdem lassen sich hierbei mit einer einzigen intravenösen Injektion nacheinander und getrennt Milz und Nieren szintigraphisch gut darstellen, da es innerhalb der ersten drei Tage nach der Applikation zu einer kontinuierlichen Anreicherung des Quecksilbers in den Nieren kommt. Schließlich fällt auch ins Gewicht, daß das Quecksilberisotop Hg^{197} eine kürzere Halbwertszeit hat als das Chromisotop Cr^{51}, und der Patient daher einer geringeren Strahlenbelastung ausgesetzt wird.

Die Bindung der beiden Substanzen an die Erythrozyten erfolgt an verschiedenen Stellen und ist offensichtlich nicht im selben Maße stabil. Nach GRAY und STERLING (8) werden ungefähr 90 % des Cr^{51} an den Globinanteil des Hämoglobins, und zwar vor allem an die -Polypeptitketten (23) gebunden, die restlichen ca 10 % an das Zellstroma bei Markierung mit Natriumchromat. Demgegenüber zeigt Quecksilber bekanntlich eine hohe Affinität zu Sulfhydrylgruppe (2). BMHP wird daher wahrscheinlich über einen R-Hg-S-Proteinkomplex in den Erythrozyten gebunden (36). Diese Bindung ist jedoch nicht so stabil wie die des Cr^{51} an das Hämoglobin. Das zeigt schon die Tatsache, daß Hg^{197} spätestens nach 24 Stunden nicht mehr in der Milz, sondern in den Nieren vorgefunden wird, so daß man zu diesem Zeitpunkt ein Nierenszintigramm schreiben kann. Den Beweis dafür, daß Hg^{197} in der Milz aus seiner ursprünglichen Bindung freigesetzt wird, lieferten SCHWARTZ u. Mitarb. (33). Sie injizierten Patienten verschieden hohe Mengen BMHP-Hg^{197} und stellten fest, daß während der Untersuchungsdauer von 24 Stunden die erythrozytengebundene Aktivität abfiel und die Serumaktivität anstieg. Parallel dazu testeten sie die Festigkeit der Erythrozytenbindung durch in-vitro-Versuche: sie inkubierten Blut mit BMHP-Hg^{197} und bestimmten über 72 Stunden die erythrozytengebundene Aktivität. Dabei zeigte sich kein

nennenswerter Abfall der Impulszahl. Eine weitere Prüfung der Stabilität dieser Bindung mit Hilfe von Waschversuchen war jedoch nicht durchgeführt worden. Für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit ergab sich daher folgende Fragestellung:

1. In welchem Prozentsatz bindet sich BMHP-Hg^{197} an die Erythrozyten bzw. das Plasma ?
2. Läßt sich die an die Erythrozyten gebundene Substanz durch Waschen der Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung wieder abtrennen ?
3. Ist hierbei eine Abhängigkeit von der Konzentration des BMHP zu erkennen ?

Zur Klärung dieser Fragen wurde Blut in vitro mit verschiedenen Mengen von BMHP versetzt, dessen Verteilung in Erythrozyten und Plasma bestimmt und die Festigkeit der Bindung in Waschversuchen geprüft.

Dem zweiten Teil der Abhandlung liegt folgende Überlegung zugrunde:

Für die szintigraphische Darstellung der Milz muß man eine genügende Anzahl markierter Erythrozyten soweit schädigen, daß sie in der Milz aufgefangen, also aus dem Kreislauf eliminiert werden. Infolge dieser Sequestration weist mindestens ein Teil der roten Blutzellen eine verkürzte Lebenszeit auf. Von einer chemischen Alteration, wie sie BMHP hervorruft, könnte man nun erwarten, daß sie gut abzustufen ist. Die Fragestellung lautet daher:

> Welches ist die minimale Konzentration der Substanz, die gerade zu einer Schädigung der Erythrozyten führt - feststellbar an einer verkürzten Lebenszeit - und die wiederum ausreicht, um die für ein Szintigramm notwendige Sequestration in der Milz herbeizuführen ?

An 14 gesunden Personen wurden daher folgende Untersuchungen angestellt:

1. Bestimmung der Lebenszeit der Erythrozyten nach ihrer Schädigung mit verschiedenen BMHP-Mengen.
2. Messung der Aktivität über Leber und Milz.

II. MATERIAL

1. Substanzen (Herstellung durch die Farbwerke Hoechst):

   a) BMHP-Hg^{197}

      Die spezifische Aktivität war 0,1 mCi/mg.
      Der Gehalt an Hg^{203} betrug 0,01 % der Gesamtaktivität.
      Der pH der isotonischen Lösung war auf 9,5 eingestellt.

   b) Inaktives BMHP

      5 %ige isotonische Lösung.

   c) ^{51}Cr als Natriumchromat in physiologischer Kochsalzlösung zur Injektion

      Die spezifische Aktivität betrug 207 mCi/mg Chrom.

2. Zählgeräte:

   a) Armac-Unterarmzähler von Packard Instrument Company, INC (La Grange, Illionis, U.S.A.).

   b) Messung der Blutproben mit einem NaJ-Bohrlochkristall von 1 3/4 x 2 Zoll der Fa. Frieseke & Hoepfner GmbH (Erlangen-Bruck)

   c) Zur Oberflächenmessung über Leber und Milz diente das Gerät FH 90 der Fa. Frieseke & Hoepfner.

Es wurde nicht im Kanal gemessen, sondern integral mit einer Eingangsempfindlichkeit von 50 mV (Basislinie).

III. METHODIK

1. Waschversuche:

Blut von gesunden Personen wurde in einer Liqueminspritze aufgezogen und mit BMHP-Hg^{197} versetzt, so daß folgende Konzentrationen vorlagen:

$2 \cdot 10^{-3}$ m
10^{-3} m
$5 \cdot 10^{-4}$ m
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$ m
$2 \cdot 10^{-4}$ m
10^{-4} m
$5 \cdot 10^{-5}$ m

Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur ca 3 Minuten lang unter Schütteln. Um eine genaue Impulsausbeute im Zählgerät zu erreichen, erwies sich eine Verdünnung von jeweils 0,1 ml des inkubierten Blutes mit 29,9 ml physiologischer Kochsalzlösung als vorteilhaft. Diese Suspension wurde als Vollblut bezeichnet. Davon wurden 2 ml ohne weitere Behandlung gemessen und 2 ml zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen, das Sediment wurde der Zählgeometrie wegen mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und dann gemessen. Die so gewonnenen Werte entsprechen der Aktivität der Erythrozyten. Anschliessend wurde wieder zentrifugiert usw. Insgesamt erfolgte zweimaliges Waschen der Erythrozyten mit jeweils 2 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung und nach jedem Waschvorgang Messung der Aktivität im NaJ-Bohrlochkristall.

2. Bestimmung der Erythrozytenlebenszeit und Messung der Oberflächenaktivität über Leber und Milz:

Wie in der Einleitung berichtet wurde, erwies sich die Bindung von Cr^{51} an die Erythrozyten als wesentlich stabiler

als von Hg^{197} BMHP. Deshalb wurden bei diesen Untersuchungen die roten Blutkörperchen mit Cr^{51} markiert und - bei einem Teil der untersuchten Personen - mit inaktivem BMHP geschädigt.

a) Cr^{51}-Markierung, keine Schädigung mit BMHP.
In ein steriles Reagenzglas gibt man 3 ml ACD-Stabilisator und 15 ml Blut der Versuchsperson.
Davon werden 2 ml im NaJ-Bohrlochkristiall gemessen, um festzustellen, ob vorher Isotope verabfolgt worden waren. Außerdem wurde die Erythrozytenzahl bestimmt.
12 ml Blut versetzt man mit 24 µCi Cr^{51} in Form von Natriumchromat, inkubiert 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad und zentrifugiert anschließend ca 3 Minuten bei 2000 bis 2200 Umdrehungen.

Mit einer sterilen Spritze wird das Plasma abgesaugt und die gleiche Menge sterile physiologische Kochsalzlösung nachgefüllt. Danach zentrifugiert man die Suspension wieder. Auf diese Art und Weise werden die Erythrozyten zweimal gewaschen und zum Schluß auf das ursprüngliche Volumen aufgeschwemmt. 0,1 ml dieser Erythrozytensuspension mit 1,9 ml Aqua dest. aufgefüllt dienen als Standard und werden zusammen mit den Blutproben der folgenden Tage gemessen, um den physikalischen Abfall des Cr^{51} zu erfassen und zugleich Schwankungen in der Empfindlichkeit des Zählgerätes auszuschalten.

Die restlichen ca 10 ml der Suspension erhält die Versuchsperson reinjiziert.

Bei einem Teil der Versuche erfolgte die erste Blutentnahme 15 bis 20 Minuten nach dieser Reinjektion, die erste Messung über Leber und Milz nach 5 bis 7 Stunden mit dem Szintillationszähler.

Bei einem anderen Teil wurden Blutproben im Abstand von 5, 15, 30, 45, 60 Minuten, 3 und 6 Stunden nach der Injektion entnommen und die Aktivität über Leber und Milz

1, 3 und 6 Stunden post injectionem gemessen. Bei allen Versuchspersonen wurde nach jeder Blutentnahme die Strahlung des Unterarmes mit dem Armac festgestellt.

In der ersten Woche täglich, in den folgenden zwei Wochen alle 2 bis 3 Tage wurde die Impulszahl von 2 ml Blut, sowie die Aktivität über Leber und Milz bestimmt. Um die Fehlerquote möglichst niedrig zu halten, wurden die Meßpunkte über den Organen mit Farbe markiert, so daß jede Bestimmung der Oberflächenaktivität über derselben Stelle erfolgte.

Schwankungen im Verhältnis von festen zu flüssigen Bestandteilen des Blutes wurden durch Bestimmung des Hämatokrits Rechnung getragen: nach Berücksichtigung des physikalischen Abfalls wurde die gemessene Impulsrate der Blutprobe durch den Hämatokrit dividiert. Die Aktivitätswerte über Leber und Milz wurden nur auf physikalischen Abfall korrigiert.

Um die Meßergebnisse der einzelnen Probanden miteinander vergleichen zu können, erweist sich folgendes Vorgehen als zweckmäßig: die korrigierte Impulszahl der Blutproben bezieht man prozentual auf die erste Probe, die gleich 100 % gesetzt wird. Diese Werte werden auf halblogarithmisches Papier aufgetragen und die Abfallgerade, die den Meßpunkten zugrunde liegt, nach Augenmaß gezogen (11, 34). Die Geraden müssen bei allen Personen unter gleichen Versuchsbedingungen annähernd denselben Verlauf zeigen. Das war auch der Fall, und es konnte daher ihr Mittelwert gebildet und zusammen mit dem 1s-Bereich auf halblogarithmisches Papier aufgetragen werden.

Analoges gilt für die Darstellung des Aktivitätsverlaufes über Leber und Milz. Alle graphischen Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden auf diese Art und Weise gewonnen.

b) Cr^{51}-Markierung und Schädigung mit BMHP.

Die Cr^{51}-Markierung entspricht der oben geschilderten Methode, nur erfolgte sie diesmal mit 50 µCi Cr^{51}. Kurz vor der Reinjektion wurde der Erythrozytensuspension inaktives BMHP zugesetzt und 3 Minuten unter Schütteln bei Zimmertemperatur inkubiert. Bei den Versuchen lagen folgende BMHP-Konzentrationen vor:

10^{-3} m
$5 \cdot 10^{-4}$ m
10^{-4} m
$5 \cdot 10^{-5}$ m
10^{-5} m

Bei 10 Versuchspersonen wurde die erste Blutprobe 30 Minuten nach der Injektion der Erythrozytensuspension entnommen, und die Aktivität über Leber und Milz nach 5 bis 7 Stunden bestimmt. Bei vier Versuchspersonen erfolgte die Blutentnahme im Abstand von 5, 15, 30, 45, 60 Minuten, 2 und 5 Stunden, und die Messung über Leber und Milz 1, 2, 4 und 7 Stunden post injectionem. Bei diesen vier Probanden wurde außerdem die Zahl der Erythrozyten in der Suspension vor der Zugabe von BMHP auf 2,5 Mill. pro mm^3 eingestellt, um dem schädigenden Agens eine einheitliche Substratmenge gegenüberzustellen. Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte auf demselben Wege wie oben beschrieben.

IV. ERGEBNISSE

1. Waschversuche:

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt. Erwartungsgemäß zeigen die Erythrozyten bei

allen vorliegenden Konzentrationen eine höhere Aktivität als das Plasma bzw. das Waschwasser. Tabelle 1 zeigt jedoch, daß stets der gleiche Prozentsatz des zugegebenen BMHP an die Erythrozyten gebunden wird, unabhängig von der Konzentration des BMHP im Ansatz: Die Mittelwerte M_1 bis M_7 streuen relativ wenig. Auch nach den beiden Waschvorgängen läßt die Erythrozytenaktivität keine prozentuale Abhängigkeit von der BMHP-Konzentration erkennen, wie die geringe Differenz zwischen den Mittelwerten M'_1 bis M'_7 bzw. M''_1 bis M''_7 zeigt.

Der Prozentsatz der Aktivität im Plasma und im Waschwasser wurde folgendermaßen ermittelt:

Aktivität des Plasmas =
Aktivität des Vollbluts
- Aktivität der Erythrozyten
($100-M_1$, $100-M_2$ etc.).

Aktivität des 1. Waschwassers =
Aktivität der Erythrozyten
- Aktivität der 1 mal gewaschenen Erythrozyten
($100-M'_1$, $100-M'_2$ etc.).

Aktivität des 2. Waschwassers =
Aktivität der 1 mal gewaschenen Erythrozyten
- Aktivität der 2 mal gewaschenen Erythrozyten
($M'_1-M''_1$, $M'_2-M''_2$ etc.).

Die entsprechenden Zahlenwerte sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Da sie trotz der verschiedenen BMHP-Konzentrationen nur gering voneinander abweichen, wurde für die Aktivität des Plasmas und der beiden Waschflüssigkeiten jeweils der Gesamtmittelwert G über die Konzentrationsreihe gebildet. Danach erscheinen durchschnittlich 36,4 % der Aktivität des Vollblutes im Plasma. Von dem an den Erythrozyten haftenden BMHP werden beim ersten Waschvorgang 10,1 % und beim zweiten Waschvorgang nochmals 7,3 % herausgelöst. BMHP ist also nicht irreversibel an die

Erythrozytenmembran gebunden. ^{197}Hg-Aktivität läßt sich sowohl im Plasma als auch im Waschwasser nachweisen. Dabei ist die Verteilung zwischen Erythrozyten und Plasma unabhängig von der zugesetzten BMHP-Menge. Durch den Waschvorgang wird stets der gleiche Prozentsatz der Substanz herausgelöst, unabhängig von der Menge des gebundenen BMHP.

2. Bestimmung der Erythrozytenlebenszeit:

Diese Untersuchungen wurden an hämatologisch normalen Patienten, sowie an gesunden Studenten durchgeführt, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt hatten. Die Patienten waren vorher nicht cytostatisch behandelt worden. Diese Therapie hätte die Lebenszeit der roten Blutkörperchen erheblich beeinflußt (39). Sie wurden alle bestrahlt, jedoch nur auf eng umschriebene Körperbezirke (kleine Bestrahlungsfelder).

Zwei Patientinnen zeigten mit Erythrozytenzahlen von 3,5 Mill./mm^3 und 3,2 Mill./mm^3 eine leichte Anämie. Sie war hervorgerufen in einem Fall durch eine Lymphogranulomatose (überwiegend im Bereich des Halses und der Axillen) und im anderen Fall durch ein Rectum-Carcinom.

Bei allen Personen erfolgten die Messungen über einen Zeitraum von 3 bis 4 Wochen.

Im Gegensatz zu den im folgenden geschilderten Ergebnissen der Blutuntersuchungen zeigen die Meßwerte, die im Armac vom Unterarm der Versuchsperson registriert wurden, erhebliche Schwankungen im Kurvenverlauf. Die Impulsrate hängt natürlich entscheidend von der Durchblutung der Extremität ab, die auf Grund von Temperaturunterschieden und eventuell vorher geleisteter physischer Arbeit nicht bei jeder Messung konstant sein konnte. Diese Ergebnisse

sind daher ihrer Ungenauigkeit wegen nicht berücksichtigt worden. Als exakter, wenn auch etwas zeitraubender erweisen sich die Bestimmungen der Aktivität von Blutproben.

Die Versuchspersonen lassen sich in drei Gruppen einteilen, bei denen die Erythrozyten mit verschiedenen BMHP-Konzentrationen geschädigt wurden. Als Konzentrationsmaß dient die Einheit Mol/l. Eine Konzentration von 10^{-3} m entspricht 0,34 mg BMHP/ml Blut.

Als Kontrollpersonen stellten sich 12 Patienten zur Verfügung. Bei ihnen wurden die roten Blutkörperchen lediglich mit Cr^{51} markiert und nicht mit BMHP versetzt.

Bei der 1. Versuchsgruppe (4 Personen) enthält die Erythrozytensuspension BMHP in der Konzentration 10^{-3} m und $5 \cdot 10^{-4}$ m, bei der 2. Gruppe (5 Personen) 10^{-4} m und bei der 3. Gruppe (5 Personen) $5 \cdot 10^{-5}$ m und 10^{-5} m.

Bei vier Versuchspersonen sind die roten Blutkörperchen auf die Zahl von 2,5 Mill./mm^3 eingestellt worden, bevor sie mit BMHP versetzt wurden, um ein exakteres Verhältnis von Substratmenge und Noxe zu schaffen. Es handelt sich um die Konzentrationen 10^{-3} m, $5 \cdot 10^{-4}$ m und 10^{-4} m. Doch weichen hierbei die Resultate keineswegs signifikant von den anderen ab, weshalb sie nicht in gesondertem Rahmen besprochen werden müssen.

Folgende Ergebnisse sind zu erkennen:
30 Minuten nach Injektion der Erythrozytensuspension ist die Aktivität im Blut bei den fünf Kontrollpersonen auf 99,2 $\pm$ 0,9 % (M $\pm$ 1s) abgefallen, bei den vier Versuchspersonen aus Gruppe 1 und 2 auf 84,6 $\pm$ 8,1 % (M $\pm$ 1s). Als Initialwert diente dabei die korrigierte Impulszahl der Blutprobe, die fünf Minuten nach Injektion der Erythrozytensuspension entnommen wurde (siehe Methodik). Wie Tabelle 3 zeigt, unterscheiden sich die gefundenen Aktivitätswerte der Gruppe 1 und 2 in keiner Weise. Es

scheint also dieser Initialabfall - innerhalb der untersuchten BMHP-Konzentration - nicht in Zusammenhang zu stehen mit der Menge des zugesetzten BMHP.

Den Aktivitätsabfall während eines Zeitraums von 14 Tagen im Blut von Kontrollpersonen und von Versuchspersonen der Gruppe 2 und 3 zeigen die Abbildungen 1 bis 4. Es wurde jeweils die Aktivität der Blutprobe, die 30 Minuten nach Injektion der Erythrozytensuspension entnommen worden war, gleich 100 % gesetzt und die korrigierten Meßwerte der folgenden Tage darauf bezogen (siehe Methodik).
Aus den Kurven kann man folgendes ersehen: Die Kontrollpersonen zeigen einen gleichmäßigen Abfall der Blutaktivität während der Untersuchungsdauer, bei den Versuchspersonen der Gruppe 2 und 3 erfolgt dieser Abfall jedoch in zwei Phasen: innerhalb der ersten 24 Stunden verläuft die Gerade steiler als in den folgenden Tagen. Die Kontrollpersonen weisen nach 24 Stunden noch 97,7 % der Ausgangsaktivität im Blut auf, die Gruppe 3 der Versuchspersonen dagegen nur noch 93,9 %, die zwei anämischen Patientinnen dieser Gruppe 91,7 % und die Probanden der 2. Gruppe 91,6 %.

Extrapoliert man diesen steil abfallenden Abschnitt der Geraden bis zum 50%-Wert, so erhält man für jene Erythrozyten die biologische Halbwertszeit. Sie wird nach dem Vorschlag von EBAUGH, EMERSON und ROSS (4) als "scheinbare halbe Erythrozytenlebenszeit" (Cr^{51}-T/2) bezeichnet. Die normale Cr^{51}-T/2 beträgt bei gesunden Individuen rund 30 Tage (27, 4, 12, 32, 40). Bei den hier untersuchten Kontrollpersonen liegt sie mit 26 Tagen im Normbereich.
Alle diese Zahlenwerte sind ohne Berücksichtigung der täglichen Chromelution von ca 1 % angegeben (28, 34). Der verstärkte Frühabfall der Aktivität bei Normalpersonen in den ersten 1 - 2 Tagen nach Markierung ("early loss"), wie er besonders von MOLLISON und VEALL (25) und HUGHES-

JONES und MOLLISON (17) beschrieben wurde, konnte bei den Kontrollpersonen nicht gefunden werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen von HEIMPEL und Mitarb. (12).

Für die erste Phase des Abfalls der Blutaktivität bei den Versuchspersonen der Gruppe 2 und 3 erhält man folgende Halbwertszeiten, die eine signifikante Verkürzung gegenüber den Kontrollpersonen bedeuten:

3. Versuchsgruppe	11,2 Tage
3. Versuchsgruppe Patienten mit Tumoranämie	7,3 Tage
2. Versuchsgruppe	7,1 Tage

Bei den hämatologisch gesunden Versuchspersonen werden also in dieser Phase die Erythrozyten in Abhängigkeit von der BMHP-Konzentration, die zur Schädigung verwandt wurde, aus dem Kreislauf eliminiert.

In der zweiten Phase fällt die Aktivität der Erythrozyten wesentlich langsamer ab. Bei der Gruppe 3 erreicht sie nach 30 Tagen den 50%-Wert, bei der Gruppe 2 ebenfalls nach 30 Tagen und bei den anämischen Patientinnen der 3. Gruppe nach 20,2 Tagen. Dieser Teil der Erythrozyten weist also bei allen hämatologisch gesunden Versuchspersonen eine normale Lebenszeit auf. Die zwei Patientinnen mit Tumoranämie zeigen sowohl in der ersten wie in der zweiten Phase des Aktivitätsabfalles eine deutliche Verkürzung der ^{51}Cr-T/2 gegenüber den gesunden Probanden derselben Versuchsgruppe.

Die Versuchspersonen der Gruppe 1 zeigten in Bezug auf den Abfall der Blutaktivität ein sehr unterschiedliches Verhalten. Es wurden daher keine Mittelwerte errechnet, sondern in der Abbildung 5 die Originalkurven wiedergegeben. Der Übersichtlichkeit wegen sind die Meßergebnisse hier nicht auf halblogarithmischem, sondern auf linearem Millimeterpapier aufgetragen worden. Infolge des exzessiv

steilen Kurvenverlaufs begeht man damit keinen nennenswerten Fehler. Bei den Versuchspersonen A und B wurde die erste Blutprobe 30 Minuten nach Injektion der Erythrozytensuspension abgenommen, bei den Versuchspersonen C und D bereits 5 Minuten post injectionem. Allen gemeinsam ist der rasche Aktivitätsabfall innerhalb der ersten 24 Stunden, so daß bei drei Versuchspersonen bereits in dieser Zeit der 50%-Wert erreicht wird, nämlich bei B nach 18 Stunden, bei C nach 14,5 Stunden und bei D nach 2,5 Stunden. Spätestens nach 24 Stunden sind diejenigen Erythrozyten, die stark geschädigt wurden, aus dem Kreislauf dieser drei Versuchspersonen eliminiert, denn von diesem Zeitpunkt an verlaufen die Kurven flacher. Die Cr^{51}-T/2 der Erythrozyten in dieser zweiten Phase beträgt bei C 27 Tage, und auch bei B und D fällt die Blutaktivität, die nach 24 Stunden noch im Kreislauf nachzuweisen ist, so langsam ab, daß man für diese Erythrozyten eine normale Lebenszeit annehmen kann.

Gegenüber den Kurven dieser drei Versuchspersonen zeigt diejenige von A einen anfangs verzögerten Abfall. Nach 24 Stunden findet man hier noch 63 % der Ausgangsaktivität, im Vergleich hierzu bei B nur 30 %. Die Cr^{51}-T/2 wird erst nach 4,8 Tagen erreicht. Vom 5. Tag an weisen dann die restlichen Erythrozyten eine normale Lebenszeit von 28 Tagen auf. Eine Deutung des abweichenden Kurvenverlaufs von A in den ersten fünf Tagen wird auf S. 23 versucht.

3. Verlauf der Oberflächenaktivität über Leber und Milz:

Mit dem Verhalten der Blutaktivität sollen nun die Meßergebnisse verglichen werden, die auf der Körperoberfläche der Probanden über Leber und Milz registriert wurden. Die Abbildungen 6 - 13 zeigen, daß bei allen Personen die Aktivität über der Milz prozentual höher liegt

als diejenige über der Leber, ein Phänomen, für das auf Seite 24 eine Erklärung versucht wird. Betrachtet man dagegen die absoluten Impulszahlen, die über den Organen erfaßt wurden, so sind diese über der Leber größer als über der Milz. Das kann mit der stärkeren Durchblutung der Leber erklärt werden, wodurch pro Flächeneinheit mehr Impulse vom Zählgerät registriert werden. Bei der Umrechnung auf Prozentzahlen wurde bei den Kontrollpersonen und bei den Versuchspersonen der 3. Gruppe derjenige Meßwert gleich 100 % gesetzt, der sieben Stunden nach Injektion der Erythrozytensuspension gewonnen worden war. Bei den Versuchspersonen der Gruppe 2 diente der Wert nach einer Stunde als Bezugsgröße. Wie im folgenden noch dargestellt wird, liegen deshalb diese Prozentzahlen höher als bei den anderen Probanden. An Hand der Abbildungen 6 - 9 erkennt man,daß bei Kontroll- und Versuchspersonen 24 Stunden nach der Injektion die Aktivität über den Organen kontinuierlich abfällt, und zwar über der Milz wesentlich langsamer als über der Leber. Die Halbwertszeit (HWZ) der Oberflächenaktivität über der Milz beträgt bei den Kontrollpersonen 48 Tage, bei der 3. Versuchsgruppe 109 Tage, bei den anämischen Patientinnen dieser Gruppe 76 Tage und bei der 2. Versuchsgruppe 53 Tage. Sie ist somit signifikant länger als die Cr^{51}-T/2 der Blutaktivität. Die Impulsrate über der Leber erreicht ihren 50%-Wert bei den Kontrollpersonen nach 28 Tagen, bei der 3. Gruppe nach 84 Tagen, bei den anämischen Patientinnen dieser Gruppe nach 29 Tagen und bei der 2. Versuchsgruppe nach 23 Tagen. Nur die Versuchspersonen der Gruppe 2 weisen demnach eine geringe Verkürzung der HWZ gegenüber den Kontrollpersonen auf, die anderen Probanden eher eine Verlängerung.

Auf Grund der Blutuntersuchungen ist ein abweichendes Verhalten der Organaktivitäten bei den Versuchspersonen gegenüber den Kontrollpersonen vor allem innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion der Erythrozytensuspension zu

erwarten. Es wurde daher bei drei Kontrollpersonen und bei zwei Versuchspersonen der Gruppe 2 der Aktivitätsverlauf über Leber und Milz innerhalb von sechs Stunden post injectionem genauer untersucht (Abb. 12 und 13). Als Bezugsgröße diente der Meßwert, der nach einer Stunde registriert worden war. Die Abbildung 12 zeigt bei den Kontrollpersonen erwartungsgemäß einen kontinuierlichen Abfall, der auch hier bei der Leber stärker ausgeprägt ist als bei der Milz. Bei den Versuchspersonen jedoch steigt die Impulsrate über der Milz zunächst an, erreicht nach 4 Stunden ihr Maximum und fällt dann ab. Die Leberaktivität zeigt ein gegenläufiges Verhalten: sie fällt zuerst ab, erreicht nach 5 Stunden ihr Minimum und steigt dann an, um jedoch im weiteren Verlauf, spätestens nach 24 Stunden, wieder abzufallen.

Betrachtet man nun das Verhalten der Organaktivität bei der 1. Versuchsgruppe (Abb. 10 und 11), so fällt der exzessiv steile Anstieg über der Leber innerhalb der ersten 24 Stunden auf. Die hohe Impulsrate bleibt über einige Tage bestehen und sinkt dann allmählich ab. Bei A und C wurde der Aktivitätsverlauf über einige Wochen verfolgt, so daß die HWZ mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden konnte. Bei A beträgt sie vom ersten Tag an gerechnet 92 Tage, bei C vom dritten Tag an gerechnet 30 Tage. Jeweils zu diesem Zeitpunkt beginnt offensichtlich bei den beiden Probanden die langsame Phase des Aktivitätsabfalles. Der prozentual unterschiedlich starke Aktivitätsanstieg bei den vier Versuchspersonen beruht darauf, daß die erste Messung jeweils zu verschiedenen Zeiten nach Injektion der Erythrozytensuspension erfolgte. Berücksichtigt man diesen Faktor, so ergeben sich annähernd gleiche Zahlenwerte für alle Probanden.

Der Aktivitätsanstieg über der Leber wird begleitet von einem Abfall über der Milz, wie aus der Abbildung 11 hervorgeht. Nach dieser schnellen Phase zeigen jedoch auch

hier A und C etwa vom 4. Tag an einen langsameren kontinuierlichen Abfall. Die HWZ, die für diesen Kurvenabschnitt ermittelt wurde, beträgt bei A 92 Tage, bei C 47 Tage. Nur bei C und D wurde ein initialer Anstieg über der Milz erfaßt, bei A und B erfolgte die erste Messung zu einem Zeitpunkt, als die Aktivität bereits wieder abfiel, wie auf Grund der Kurve von D vermutet werden kann. In geringem Maße abweichend verhält sich C gegenüber den anderen Versuchspersonen der Gruppe. Zu Beginn der Messungen sinkt die Impulsrate kurzzeitig ab, bevor sie von der fünften Stunde an steigt. Da aber dieses Phänomen über beiden Organen zu beobachten ist, dürfte ein Meßfehler nicht ausgeschlossen sein.

Im Prinzip zeigt also die erste Versuchsgruppe ein ähnliches Verhalten - nur mit einer zeitlichen Verschiebung - wie die zwei Versuchspersonen der 2. Gruppe (Abb. 13). Zwar wurde der initiale Abfall über der Leber nicht registriert, was ein Hinweis dafür sein kann, daß auch der maximale Anstieg über der Milz nicht erfaßt wurde. Jedoch war auch hier der anschließende Aktivitätsabfall über der Milz von einem Anstieg über der Leber begleitet, und dieser raschen Phase folgte eine langsame, in der die Aktivität über beiden Organen parallel, wenn auch mit gewisser Verzögerung, zu derjenigen des Blutes absank.

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1. Vergleich der eigenen Untersuchungen mit Angaben der Literatur über Waschversuche an Erythrozyten.

Die Festigkeit der Bindung zwischen BMHP und den Erythrozyten wurde schon von einigen Autoren untersucht (26, 33, 36). Sie verwandten jedoch für ihre Versuche meist höhere BMHP-Mengen. Nur MUNDSCHENK und FISCHER (26) sowie SCHWARTZ

und Mitarb. (33) berichteten auch über Untersuchungen in einem Konzentrationsbereich, der in der vorliegenden Arbeit geprüft wurde. Die genannten Autoren konnten keinen Elutionseffekt bei mehrmaligem Waschen von inkubierten Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung feststellen. Bei den hier beschriebenen Versuchen ergab sich dagegen ein Aktivitätsverlust von 10,1 % nach dem ersten und von 7,3 % nach dem zweiten Waschvorgang. Diese Diskrepanz läßt sich eventuell mit der verschiedenen Inkubationsdauer erklären.
MUNDSCHENK und FISCHER (26) haben die Blutproben 120 Minuten nach Zusatz von BMHP zu den Erythrozyten gemessen, während bei den hier beschriebenen Versuchen ca 3 Minuten abgewartet wurde. Die Autoren wiesen durch ihre Untersuchungen nach, daß bei niedrigen BMHP-Konzentrationen von etwa 0,1 mg BMHP/ml Erythrozyten die Hg^{197}-Aktivität in den Erythrozyten von der Inkubationsdauer abhängt. Bei NaCl-Suspension tritt dieser Effekt nicht so stark zutage wie bei Plasmasuspension der roten Blutkörperchen. Doch ist auch hier der Markierungsvorgang offensichtlich erst nach 50 Minuten vollständig abgeschlossen. In der vorliegenden Arbeit betrug die höchste BMHP-Konzentration 0,68 mg BMHP/ml Blut. Rechnet man mit Hilfe des Hämatokrit diesen Wert um auf die von MUNDSCHENK und FISCHER verwendete Einheit mg BMHP/ml Erythrozyten, so erhält man einen Zahlenwert in der Größenordnung von 0,15. Für die vorliegenden Versuche müßte demnach die Beobachtung von MUNDSCHENK und FISCHER ebenfalls zutreffen. Sie steht jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen von WALLER über die Hemmung von Erythrozytenenzymen durch BMHP, die in Abschnitt 2 diskutiert werden sollen.

Übereinstimmend beschreiben FISCHER und MUNDSCHENK (6) sowie SCHWARTZ und Mitarb. (33) von Untersuchungen an Patienten, daß BMHP nicht nur an den Erythrozyten, sondern auch im Serum nachzuweisen ist. SCHWARTZ studierte dieses

Phänomen mit Hilfe von in-vitro-Versuchen genauer und fand, daß trotz verschieden langer Inkubationszeiten der BMHP-Gehalt der Erythrozyten fast unverändert bei 90 % lag. Nach den hier erzielten Ergebnissen werden - unabhängig von der BMHP-Konzentration - rund 36 % der Aktivität im Plasma gebunden, vermutlich ebenfalls an SH-Gruppen.

2. Mechanismus der Schädigung der Erythrozyten durch BMHP:

Erstaunlich ist die Tatsache, daß man bei den Elutionseffekten und bei der Verteilung von BMHP in Plasma und Erythrozyten keine Abhängigkeit von der BMHP-Konzentration erkennen kann. Immer bindet sich derselbe Prozentsatz der Substanz an die roten Blutzellen. Den Vorgang der Bindung stellen sich MUNDSCHENK und FISCHER (26) nun folgendermaßen vor:

BMHP-Lösung ist nur im alkalischen Bereich beständig. Bei Erniedrigung des pH-Wertes unter 9 erhält man eine fein verteilte Suspension von BMHP, die nach kurzer Zeit unter Kornvergrößerung in einen flockigen Niederschlag übergeht. Bei der Markierung von Ersthrozyten mit alkalischer Lösung von BMHP kommt es zu demselben Vorgang, denn die Suspension hält auf Grund der Pufferwirkung von Plasma und Zellen ihren pH-Wert von 7 - 8. Die Abscheidung von BMHP auf der Erythrozytenoberfläche erfolgt in kleinen Molekülaggregaten, welche zunächst adsorptiv gebunden werden. Diese können dann einerseits mit den SH-Gruppen der Membran Bindungen eingehen, andererseits durch Diffusion weiter in das Zellinnere vordringen.

Nach WALLER (37) wirkt hier BMHP nun hemmend auf einige Enzyme des Erythrozytenstoffwechsels: die Glutathionre-

duktase (GR), die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PHD) und die Pyruvatkinase (PK). Sie wurden daher gleichzeitig mit den Untersuchungen zur Erythrozytenlebenszeit bestimmt (1, 16, 29). Die Durchführung der Emzymteste erfolgte dankenswerterweise im Labor von Professor Dr.med. H.D. Waller, Med.Univ.-Klinik Tübingen.

Die hierfür benötigten Blutproben wurden der Erythrozytensuspension unmittelbar vor und ca 3 Minuten nach der Zugabe von BMHP entnommen. Die Dauer der Inkubation mit BMHP spielt nach WALLER in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich keine Rolle für die Hemmung der Enzyme. Sie ist 3 Minuten nach Zusatz des BMHP zu den Erythrozyten schon ebenso stark wie zwei Stunden später.

Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen können folgendermaßen zusammengefaßt werden:
Bei der BMHP-Konzentration 10^{-3}m und $5 \cdot 10^{-4}$ m (Versuchsgruppe 1) ist die GR 100 % gehemmt, die G-6-PDH zwischen 33 % und 68 %, die PK zwischen 0 % und 63 %. G-6-PDH und PK zeigen auch bei den anderen BMHP-Konzentrationen starke Schwankungen in ihrer Aktivität, so daß sich keine exakte Korrelation zu der vorgegebenen Menge an BMHP feststellen läßt.

Von der Gruppe 2 (BMHP-Konzentration 10^{-4} m) zeigen diejenigen Versuchspersonen, bei denen die Erythrozytensuspension auf 2,5 Mill. Zellen pro mm^3 eingestellt wurde, eine 100 %ige Hemmung der GR. Bei den anderen Probanden dieser Gruppe, die Erythrozytenzahlen von 3,7 Mill./mm^3, 4,2 Mill./mm^3 und 4,6 Mill./mm^3 aufwiesen, beträgt die Hemmung 29 %, 52 % und 59 %.

Bei der 3. Versuchsgruppe mit der BMHP-Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ m und 10^{-5} m ist die GR zwischen 11 % und 50 % gehemmt. Da hierbei jedoch die Erythrozytenzahlen nicht standardisiert waren, besitzen diese Werte nur bedingte Aussagekraft.

Obwohl die GR bei den Probanden der Gruppe 1 und 2 vollständig gehemmt war, fällt doch - wie in den Abb. 4 und 5 gezeigt wurde - die Cr^{51}-Aktivität im Blut in den ersten 24 Stunden post injectionem bei beiden verschieden stark ab. Die Annahme liegt nahe, daß für dieses Verhalten andere Enzyme verantwortlich sind. LÖHR und Mitarb. (22) wiesen bei in vivo alternden Erythrozyten einen Abfall der G-6-PDH nach, was zu einer Störung des Pentosephosphatzyklus und damit zur mangelhaften Nukleotidsynthese führt. G-6-PDH- und PK-Hemmung bei den hier durchgeführten Versuchen stehen aber in keiner erkennbaren Korrelation zu der verwandten BMHP-Menge und erklären also auch nicht die unterschiedlich schnelle Elimination der roten Blutkörperchen aus dem Kreislauf. Offensichtlich spielt die Hemmung der Enzyme bei der Alteration der Erythrozyten duch BMHP nicht die entscheidende Rolle, sondern die Hemmung der Membransulfhydrylgruppen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von JACOB und JANDL (18, 19, 20) überein, die die Blockierung von Sulfhydrylgruppen an Erythrozytenmembranen durch spezifische Inhibitoren untersuchten. Sie verwandten zwei Substanzen: p-chloromercuri-benzoat, das nicht in die intakte Zelle einströmt, und N-aethylmaleinimid, das schnell in normale Erythrozyten eindringt. In beiden Fällen zeigte sich, daß eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen verbunden war mit der Hemmung von Membransulfhydrylgruppen. Es bestand keine Relation zur Hemmung der intrazellulären Sulfhydrylgruppen oder der zellulären Glykolyse.

Da bei der vorliegenden Arbeit die Erythrozyten gleichzeitig mit Cr^{51} markiert waren, mußte eine toxische Wirkung des metallischen Chroms auf die Erythrozyten ausgeschlossen werden. Nach NECHELESS und Mitarb. (27) tritt sie erst bei einer Konzentration von mehr als 30 γ/ml Vollblut auf. Wird diese Chromkonzentration überschritten,

so entsteht infolge der oxydierenden Eigenschaften des Chromats Methämoglobin und die Erythrozytenglykolyse ist gehemmt. Wie Enzymuntersuchungen an den Kontrollpersonen zeigten, hatte jedoch die Menge an Natriumchromat, die zur Markierung bei diesen Versuchen verwandt wurde, keinen Einfluß auf die Enzymaktivitäten.

3. Einfluß des BMHP auf die Erythrozytenlebenszeit:

Offenbar werden nicht alle inkubierten Erythrozyten durch BMHP in gleichem Maße geschädigt. Die Kurve der Blutaktivität zeigt bei allen drei Versuchsgruppen zwei Phasen. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Reinjektion der Erythrozytensuspension erfolgt ein mehr oder weniger steiler Abfall der Aktivität, je nach der zugesetzten BMHP-Menge, danach verlaufen die Kurven aller Probanden annähernd parallel zu denjenigen der Kontrollpersonen. Es handelt sich also um zwei Zellpopulationen: die eine wird geschädigt und innerhalb von 24 Stunden aus dem Kreislauf eliminiert, die andere zeigt eine normale Lebenszeit. Man kann wohl mit Recht annehmen,daß die älteren Zellen anfälliger sind für eine Noxe, wie in diesem Fall BMHP, als die jüngeren, und daß sie es daher sind, die beschleunigt aus dem Kreislauf entfernt werden. Je höher die Dosis der Noxe, um so mehr Erythrozyten werden von ihr erfaßt, umso steiler ist der Abfall der Blutaktivität in den ersten 24 Stunden post injectionem. Zu diesem Ergebnis kamen auch SCHWARTZ und Mitarb. (33). Sie injizierten zwei Patienten eine hohe (4 mg) und eine niedrige (0,9 mg) Menge BMHP. Danach stellten sie fest, daß bei der höheren Dosierung die Hg^{197}-Aktivität im Blut während der Untersuchungsdauer von 24 Stunden stärker abfiel als bei niedriger Dosierung.

Bei den vorliegenden Versuchen läßt sich eine gute Korrelation zwischen der verwendeten BMHP-Konzentration und

der Cr^{51}-T/2 der ersten Phase im Abfall der Blutaktivität aufstellen. In der ersten Gruppe zeigt jedoch A einen verzögerten Abfall gegenüber den anderen Versuchspersonen. Dieser Proband hatte einige Zeit zuvor wiederholt Blut gespendet. Die Erythrozytenpopulation, die mit BMHP geschädigt wurde, zeigte also sicher eine Verschiebung in Richtung auf die jungen Zellen. Wenn diese nun weniger anfällig sind für eine Noxe, wie oben angenommen wurde, so resultiert daraus ein vergleichsweise langsamerer Abfall der Blutaktivität, wie dies auch tatsächlich bei A gefunden wurde.

Die zwei anämischen Patientinnen der Gruppe 3 verhalten sich ebenfalls etwas abweichend. Sowohl in der ersten wie in der zweiten Phase ist die Cr^{51}-T/2 gegenüber den anderen Probanden derselben Gruppe merklich verkürzt. Dies überrascht nicht, denn die Ursache für Carcinomanämien ist ein Eisenmangel, und eine Verkürzung der Erythrozytenlebenszeit bei Eisenmangelanämie ist bekannt (9). Daß es sich nicht um eine extrakorpuskulär bedingte hämolytische Anämie handelt, beweist der Aktivitätsverlauf über Leber und Milz dieser beiden Patientinnen. In diesem Fall wäre nämlich ein Anstieg der Impulsrate über der Milz zu verzeichnen gewesen. Wie jedoch aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, fällt die Organaktivität kontinuierlich ab. Die HWZ differiert nicht wesentlich von derjenigen der Kontrollpersonen (siehe S. 15).

4. Interpretation des Aktivitätsverlaufes über Leber und Milz und Hinweise für die Milzszintigraphie:

Der initiale Abfall der Blutaktivität bei den Versuchspersonen wird, wie die Abbildungen 10, 11 und 13 zeigen, von einem raschen Anstieg der Impulsrate über der Milz begleitet, dem wiederum ein Aktivitätsanstieg über der Leber folgt. Die durch BMHP geschädigten Erythrozyten werden also

zunächst in der Milz sequestriert. Aus den zugrundegehenden Zellen tritt das Hämoglobin aus und wird im reticuloendothelialen System von Milz, Leber und Knochenmark aufgespalten (9). Der Globinanteil mit dem relativ fest daran gebundenen Chromisotop (23) wandert dann zum weiteren Ab- und Umbau in die Leber, was einen Anstieg der Impulsrate über der Leber und einen gleichzeitigen Abfall über der Milz zur Folge hat. Im weiteren Verlauf sinkt bei beiden Organen die Aktivität kontinuierlich ab, bei der Milz jedoch langsamer als bei der Leber. Außerdem zeigt die Milz - auch bei den Kontrollpersonen - ständig prozentual höher liegende Werte als die Leber. Diese Beobachtung wurde von anderen Autoren nicht gemacht (7, 12). Sie berichteten, daß die Halbwertszeit der Aktivitäten über Herz, Leber und Milz nicht wesentlich von derjenigen des Blutes abwich. Die hier gewonnenen Ergebnisse können nur so gedeutet werden, daß durch die Manipulation des Waschens und Zentrifugierens ein geringer Prozentsatz von Erythrozyten eine Schädigung erfuhr und in der Milz abgefangen wurde. Der langsame Aktivitätsabfall läßt sich mit einer verzögerten Abwanderung von Cr^{51} aus dem reticuloendothelialen System der Milz erklären, doch ist damit der Kurvenverlauf nicht sehr befriedigend gedeutet.

Der zum Teil abweichenden Halbwertszeit der Organaktivität von Versuchspersonen gegenüber den Werten der Kontrollpersonen in der zweiten Phase des Abfalls ist sicherlich keine sehr große Bedeutung beizulegen, da bei der Messung über der Körperoberfläche individuelle anatomische Verschiedenheiten der einzelnen Probanden zu Meßergebnissen mit teilweise erheblicher Streubreite führen.

Interessant für die Milzszintigraphie ist jedoch nur der Kurvenverlauf innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion der BMHP-geschädigten Erythrozyten. Von anderen Autoren (5, 6, 33, 36) wurden meist höhere Mengen von BMHP verwandt (0,26 bis 10 mg BMHP/ml Blut), was zu einem maximalen

Anstieg der Milzaktivität innerhalb von 1 - 2 Stunden post injectionem führte. Die hier beschriebenen Versuche wurden mit niedrigeren BMHP-Konzentrationen durchgeführt. Bei einer Menge von 0,034 mg BMHP/ml Blut (2. Versuchsgruppe) erreichte die Impulszahl über der Milz nach 4 Stunden ihr Maximum (Abb. 13). Sie lag jedoch nur 10 % über dem 1-Stunden-Wert. Es bleibt zu prüfen, ob dieser Wert ausreichend hoch ist, um eventuell unter Verwendung einer hohen spezifischen Aktivität von BMHP-Hg^{197} ein gutes Milzszintigramm zu ergeben (31). Für die Konzentration 0,34 mg BMHP/ml Blut (1. Versuchsgruppe) ist diese Frage bereits geklärt. Für Milzszintigraphien, die im Strahleninstitut Tübingen gewöhnlich eine Stunde nach Injektion der BMHP-geschädigten Erythrozyten durchgeführt werden, wird diese BMHP-Konzentration seit einiger Zeit verwandt und damit gut zu interpretierende Darstellungen des Organs erhalten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit werden folgende an Hand von Waschversuchen gewonnenen Ergebnisse geschildert:

1. Die Verteilung von BMHP-Hg^{197} zwischen Erythrozyten und Plasma ist im Konzentrationsbereich $2 \cdot 10^{-3}$ m bis $5 \cdot 10^{-5}$ m prozentual unabhängig von der zugesetzten BMHP-Menge.
2. Im gleichen Konzentrationsbereich wird beim Waschen stets der selbe Prozentsatz der Substanz herausgelöst, unabhängig von der Menge des gebundenen BMHP.

Im zweiten Teil der Arbeit wird über die Erythrozytenlebenszeit und die Oberflächenaktivität über Leber und Milz bei Versuchspersonen berichtet, deren Erythrozyten mit

Cr^{51} markiert und mit inaktivem BMHP in den Konzentrationen 10^{-3} m bis $5 \cdot 10^{-5}$ m geschädigt wurde. Die Ergebnisse können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Die Kurve der Blutaktivität verläuft biphasisch. Die Steilheit in der ersten Phase hängt von der BMHP-Konzentration ab.
2. Der Verlauf der Organaktivitäten innerhalb der ersten 24 Stunden post injectionem kann ebenfalls mit der verwendeten BMHP-Konzentration korreliert werden.
3. An Hand von Literaturangaben und von Enzymuntersuchungen, die in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen durchgeführt wurden, wird der Mechanismus der Erythrozytenschädigung durch BMHP diskutiert.

Konzentration	$2 \cdot 10^{-3}$m	10^{-3}m	$5 \cdot 10^{-4}$m	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$m	$2 \cdot 10^{-4}$m	10^{-4}m	$5 \cdot 10^{-5}$m
Aktivität der Erythrozyten in % der Vollblutaktivität	84,2 56,3	74,5 86,3 73,8 81,3 63,8 69,5 59,8 68,9 68,3	74,9 62,6 47,5	56,8 56,8	87,5 33,6 53,4	90,5 73,0 61,7	38,5 58,6 56,8
	M_1=70,2 ± 39,4	M_2=71,8 ± 16,6	M_3=61,7 ± 13,7	M_4=56,8 ± 0,0	M_5=58,2 ± 54,6	M_6=75,1 ± 29,0	M_7=51,3 ± 22,2
Akt. der einmal gewaschenen Ery in % der nicht gewaschenen Ery.	94,5 86,9	93,2 90,7 92,6 93,1 88,2 88,4 92,7 88,0 88,7	94,2 87,5 85,0	84,5 87,4	94,2 86,3 92,9	92,9 92,0 90,0	92,7 89,0 87,8
	M'_1=90,7 ± 11,0	M'_2=90,6 ± 4,6	M'_3=88,9 ± 5,6	M'_4= 85,9 ± 4,2	M'_5=91,1 ± 8,4	M'_6=91,6 ± 3,0	M'_7=89,8 ± 5,2
Akt. der zweimal gewaschenen Ery in % der nicht gewaschenen Ery.	89,5 80,8	88,2 86,0 88,4 89,4 81,7 81,6 87,5 81,0 79,6	87,8 80,7 75,2	77,3 78,0	89,3 76,7 86,3	88,2 89,3 84,2	87,5 79,4 80,1
	M''_1=85,1 ± 12,4	M''_2=84,8 ± 7,6	M''_3=81,2 ± 12,6	M''_4=77,6 ± 1,0	M''_5=84,1 ± 13,2	M''_6=87,2 ± 5,4	M''_7=82,3 ± 9,0

Tabelle 1.: Waschversuche mit BMHP-inkubiertem Blut (M ± 2s)

Prozentualer Anteil von BMHP in nicht gewaschenen, ein- und zweimal gewaschenen Erythrozyten.

Konzentration	Akt. des Plamas bez. auf Vollblut	Akt. des 1. Waschwassers bez. auf die Erythrozyten	Akt. des 2. Waschwassers bez. auf die gewaschenen Erythrozyten
$2 \cdot 10^{-3}$ m	29,8	9,3	6,2
10^{-3} m	28,2	9,4	6,3
$5 \cdot 10^{-4}$ m	38,3	11,1	8,7
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$ m	43,2	14,1	9,8
$2 \cdot 10^{-4}$ m	41,8	8,9	7,8
10^{-4} m	24,9	8,4	4,8
$5 \cdot 10^{-5}$ m	48,7	10,2	8,3
	G = 36,4	G = 10,1	G = 7,3
	$\pm$ 17,8	$\pm$ 3,8	$\pm$ 3,4

Tabelle 2: Prozentualer Anteil von BMHP-Hg^{197} in Plasma und Waschwasser

Mittelwert G $\pm$ 2s über die Konzentrationsreihe

Kontrollpersonen	Versuchspersonen
Keine Schädigung der Erythrozyten	Schädigung der Erythrozyten mit BMHP
97,8 %	87,6 % (BMHP 10^{-3} m)
99,3 %	72,6 % (BMHP $5 \cdot 10^{-4}$m)
100,0 "	88,2 % (BMHP 10^{-4}m)
99,1 %	90,0 % (BMHP 10^{-4}m)
99,8 %	
M = 99,2 $\pm$ 0,9	M = 84,6 $\pm$ 8,1

Tabelle 3: Abfall der Erythrozytenaktivität nach 30 Minuten Mittelwert und 1s-Bereich.

Abb. 1 Abfall der Blutaktivität bei Kontrollpersonen
Mittelwert und 1s-Bereich von 8 Personen

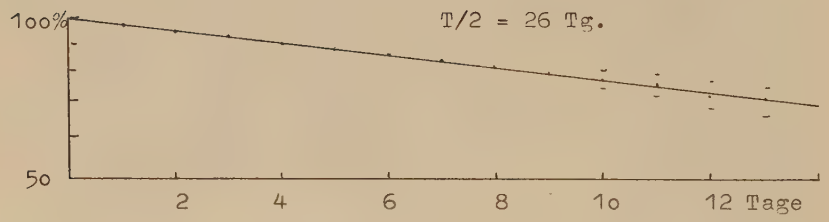


Abb. 2 Abfall der Blutaktivität bei Versuchsgruppe 3
BMHP-Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$m und 10^{-5}m
Mittelwert und 1s-Bereich von 3 Personen

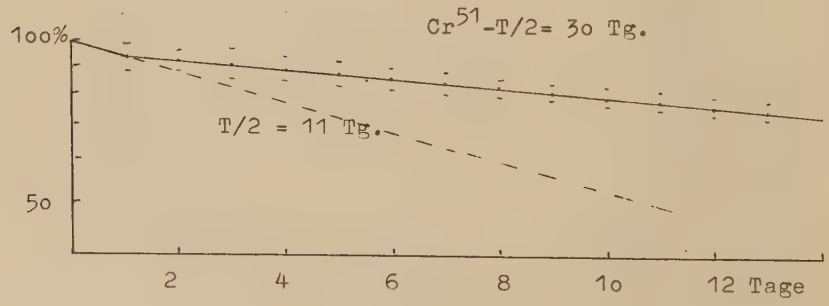


Abb. 3 Abfall der Blutaktivität bei 2 anämischen Patientinnen der Versuchsgruppe 3
BMHP-Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ m
Mittelwert und 1s-Bereich

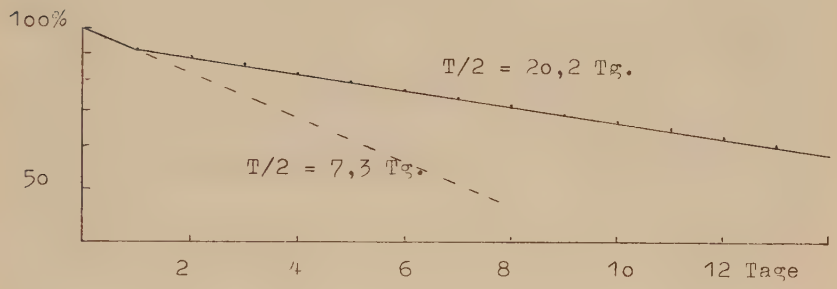


Abb. 4 Abfall der Blutaktivität bei Versuchsgruppe 2
BMHP-Konzentration 10^{-4} m
Mittelwert und 1s-Bereich von 5 Personen

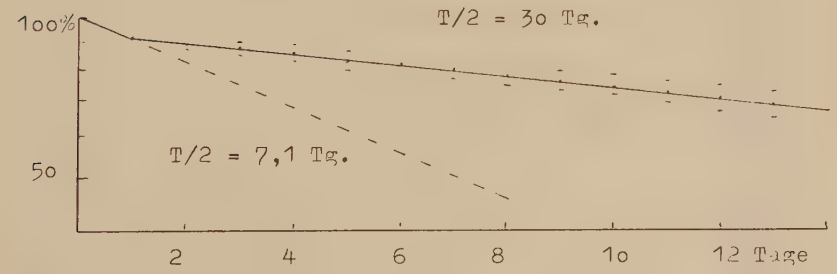
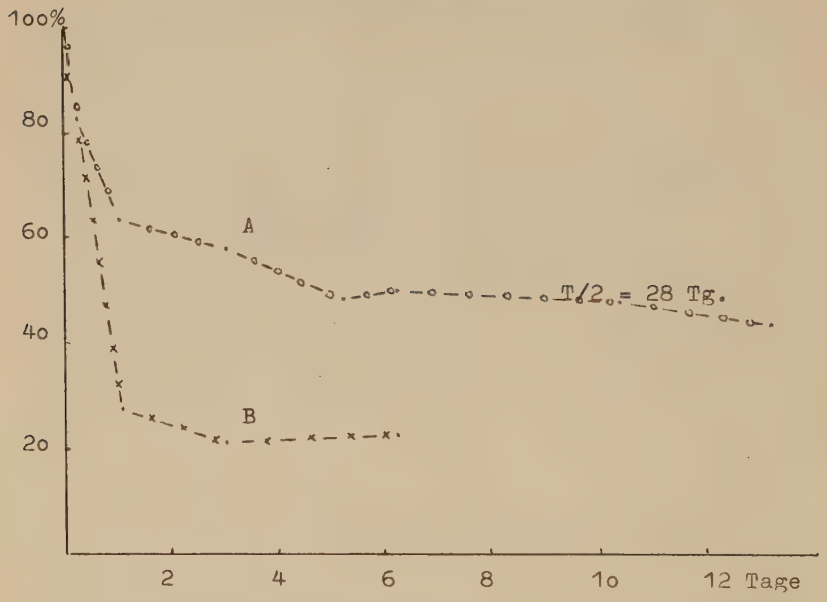


Abb. 5 Abfall der Blutaktivität bei Versuchsgruppe 1
BMHP-Konzentration $1o^{-3}$m und $5 \cdot 1o^{-4}$m
a) 1.Blutentnahme 3o min. p.i.



b) 1.Blutentnahme 5 min. p.i.

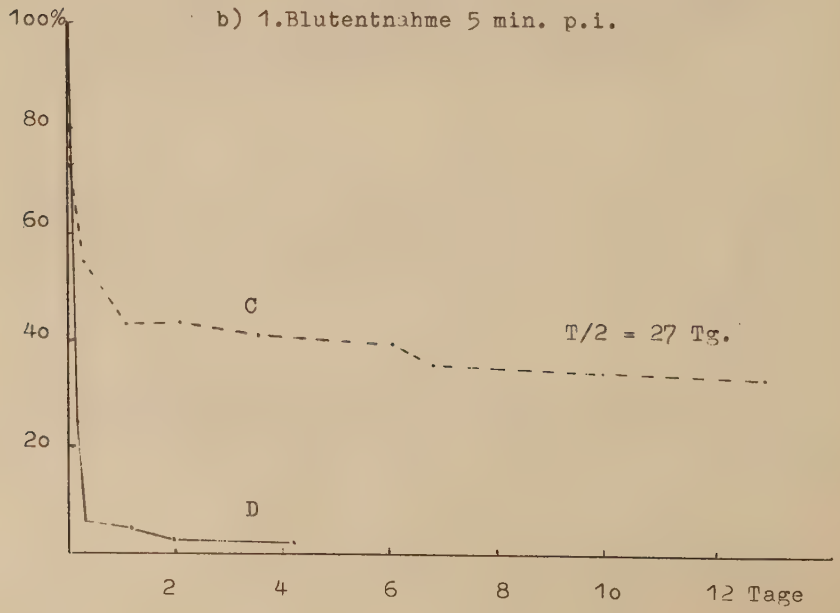


Abb. 6 Abfall der Organaktivitäten bei Kontrollpersonen
Mittelwert und 1s-Bereich von 7 Personen
1.Messung 7 Std. p.i.

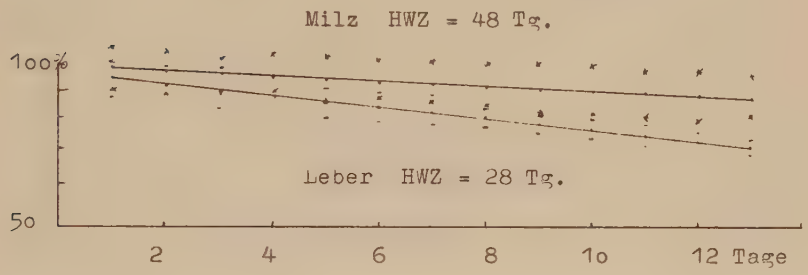


Abb. 7 Abfall der Organaktivitäten bei Versuchsgruppe 3
Mittelwert und 1s-Bereich von 2 Personen
1.Messung 7 Std. p.i.

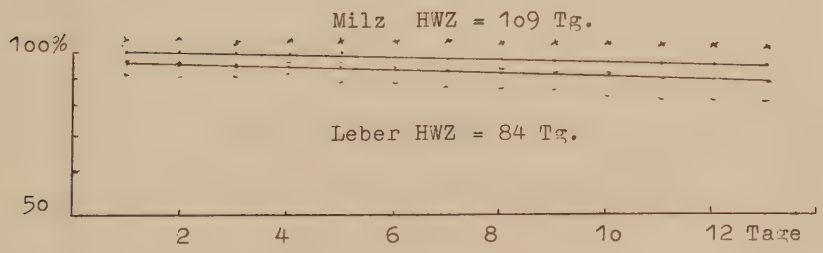


Abb. 8 Abfall der Organaktivitäten bei Versuchsgruppe 3
Mittelwert und 1s-Bereich von 2 anämischen Patientinnen
1.Messung 7 Std. p.i.

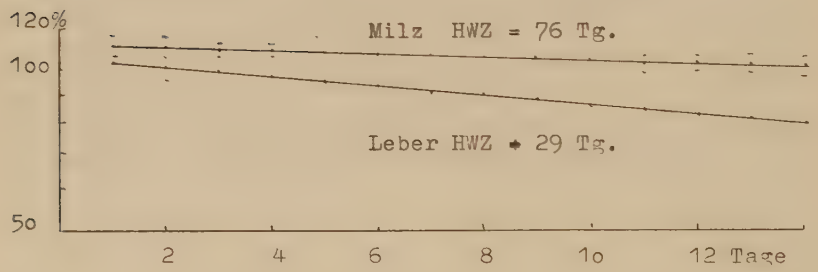


Abb. 9 Abfall der Organaktivitäten bei Versuchsgruppe 2
Mittelwerte und 1s-Bereich von 5 Personen
1.Messung 1 Std. p.i.

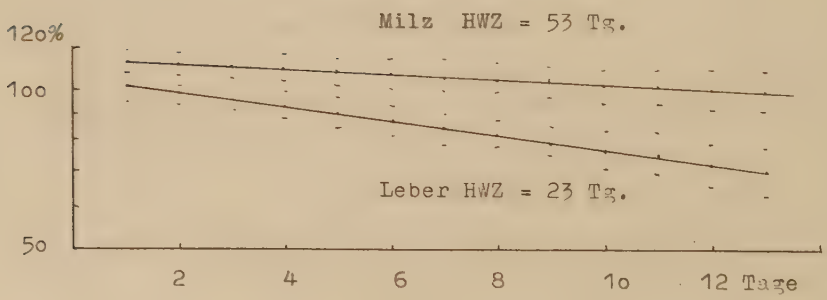


Abb. 1o Verhalten der Aktivität über der Leber bei Versuchsgruppe 1

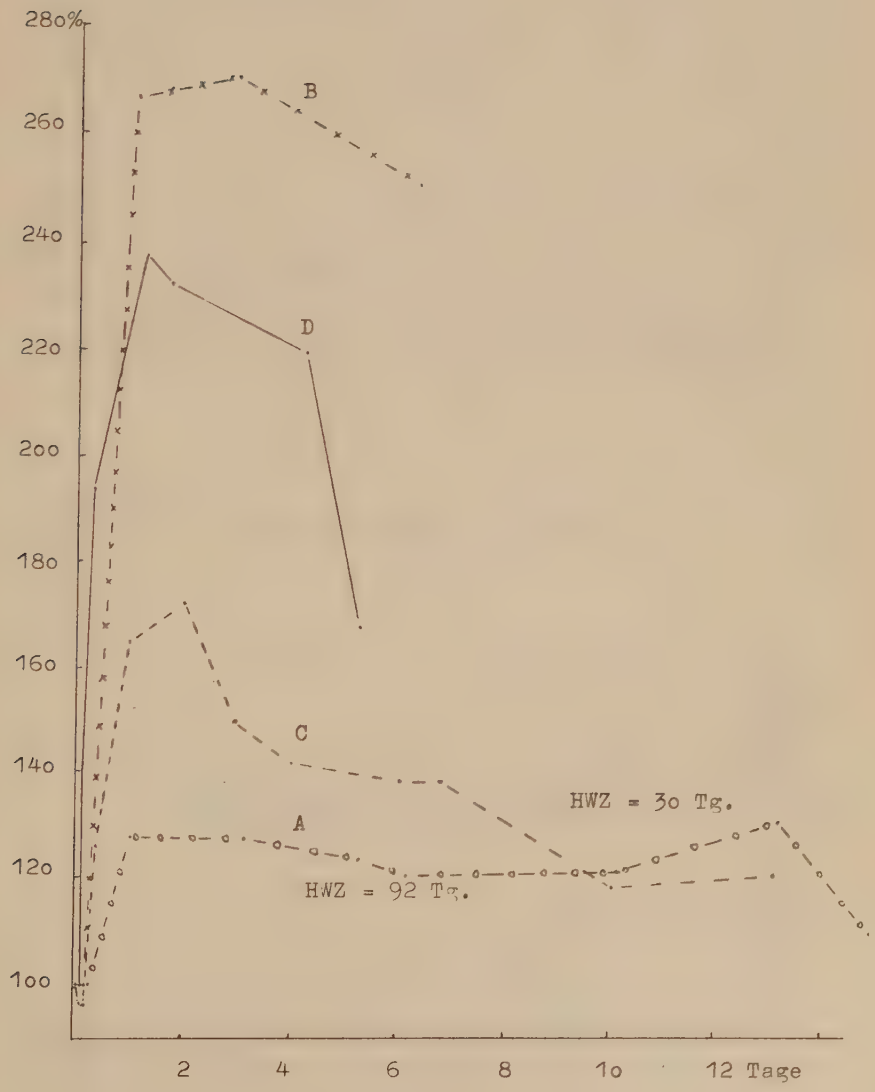
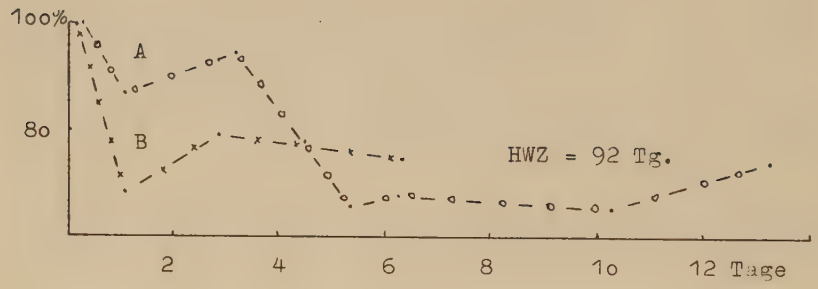


Abb. 11 Verhalten der Milzaktivität bei Versuchsgruppe 1
a) 1.Messung 6 und 7 Std. p.i.



b) 1.Messung 1 und 2 Std. p.i.

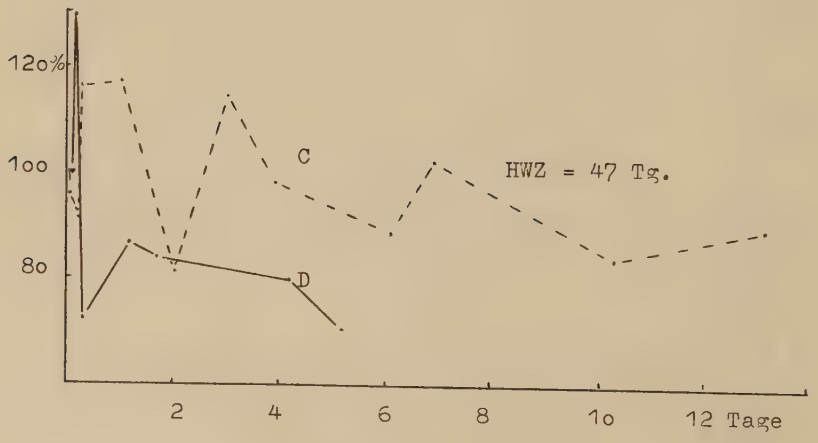
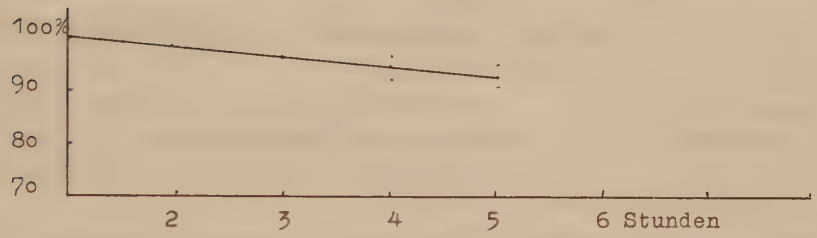


Abb. 12 Abfall der Organaktivitäten bei Kontrollpersonen
Mittelwert und 1s-Bereich von 3 Personen
1. Messung 1 Std.p.i.
a) Milz



b) Leber

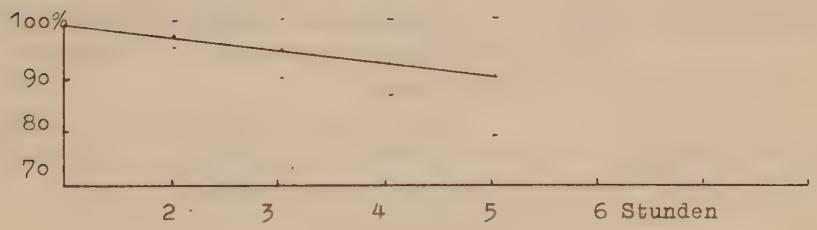
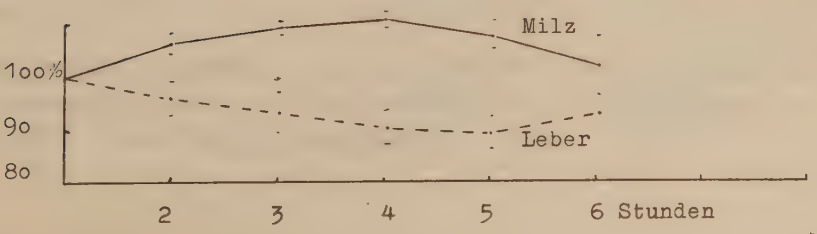


Abb. 13 Abfall der Organaktivitäten bei Versuchsgruppe 2
Mittelwert und 1s-Bereich von 2 Personen
1. Messung 1 Std.p.i.



VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BEISENHERZ, G., H.J.BOLTZE, Th.BÜCHER, R.CZOK, K.H.GARBADE, E.MEYER-ARENDT und G.PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z.Naturforsch. 8b, 555-577 (1953).

2. BENESCH, R.E. and R. BENESCH: Relation between erythrocyte integrity and sulfhydryl groups. Arch.Biochem. 48, 38-42 (1954).

3. CROLL, M.N., L.W.BRADY, I.BRODSKY, L.STANTON: A new agent for splenic scanning: BMHP. Radiology 84, 492-495 (1965).

4. EBAUGH, F.G., C.P.EMERSON, J.F.ROSS: The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival in vivo. J.clin.Invest. 32, 1260-1276 (1953).

5. FISCHER, J.: Die Milzszintigraphie. Der Radiologe 372-381 (1965).

6. FISCHER, J., H.MUNDSCHENK u.R.WOLF: Milzszintigraphie mit 1-Bromomercuri (^{197}Hg)-2-hydroxypropan (BMHP). Fortschr.Röntgenstr. 103, 349-366(1965).

7. GEHRMANN, G.: Untersuchungen mit radioaktivem Chrom bei hämolytischen Anämien. Dtsch.med.Wschr. 85, 1097-1102(1960).

8. GRAY, S.J., K. STERLING: The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J.clin.Invest. 29, 1604-1613 (1950).

9. GROSS, R. u.D.JAHN: Lehrbuch der Inneren Medizin. F.K.Schattauer-Verlag Stuttgart 1966.

10. HASSAN,K.AWWAD, L. MOUSSA, A.S. SHERAKI: The effect of red cell aging on chromium-51 binding and in vitro elution. J.Nucl.Med. 7, 687-695 (1966).

11. HEIM-SCHUMACHER-FORST: Radioaktive Isotope in der Chirurgie. Walter de GRUYTER-Verlag,Berlin,1961.

12. HEIMPEL,H.,W.KEIDERLING, W.SCHOEPPE et al.: Untersuchungen zur Bestimmung der Erythrozytenlebenszeit und des Abbauortes der Erythrozyten bei Gesunden mit Hilfe der ^{51}Cr-Markierung in vitro u.in vivo. Nuklear-Medizin 2, 217-233 (1962).

13. HENNIG,K.,W.G.FRANKE, P.WOLLER, P.KNOLL: Bisherige Erfahrungen bei der Milzszintigraphie mit Brommerkuri-Hydroxypropan (BMHP-^{197}Hg). Nuclear-Medizin 4, 370-382 (1965).

14. HENNIG,K.,W.G.FRANKE, P.WOLLER, P.KNOLL: Szintigraphie der Milz mit Brommerkuri-Hydroxypropan (BMHP-^{197}Hg). Med. Welt 575-579 (1966).

15. HENNIG,K.,W.G.FRANKE, P.WOLLER, P.KNOLL: Weitere Erfahrungen mit der Milzszintigraphie. Strahlentherap. 129, 497-504 (1966).

16. HORECKER, B.L., A. KORNBERG: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. In: Methods in Enzymology Vol.I, 323-327. New York, Academic Press,1955.

17. HUGHES-JONES, N.C., P.L.MOLLISON: The interpretation of measurement with ^{51}-Cr-labelled red cells. Clin.Sci. 15, 207 (1956).

18. JACOB, H.S. and JANDL, J.H.: Effect of membrane sulfhydryl deficiency on the shape and survival of red cells. Clin.Res. 9, 162 (1961).

19. JACOB,H.S. and JANDL, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells.I.Mechanism of hemolysis. J.clin.Invest. 41, 779-792 (1962).

20. JACOB, H.S. and JANDL, J.H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells.II.Studies in vivo. J.clin.Invest. 41, 1514-1523(1962).

21. JOHNSON,Ph.M., J.C.HERION,S.L.MOORING: Scintillation scanning of the normal human spleen utilizing sensitized radioactive erythrocytes. Radiology 74, 99-101 (1960).

22. LÖHR,G.W.,H.D.WALLER, O.KARGES,B.SCHLEGEL, A.A. MÜLLER: Zur Biochemie der Alterung menschlicher Erythrozyten. Klin.Wschr. 36, 1008-1013 (1958).

23. MALCOLM, D.,H.M.RAMEY and A.S.JACOBS: Association of radioactive chromium with compenents of hemoglobin. Nucl. Med. 3, 234 (1963).

24. MIESCHER,P.,H.BERGER, A.GILARDI, O.HEGGLIN: Die Lebensdauer von ^{51}Cr-markierten Erythrozyten in verschiedenen Lebensaltern. Sonderb.Strahlentherap.38,236-243(1958).

25. MOLLISON,P.L. and N.VEALL: The use of the isotope ^{51}Cr as a label for red cells. Brit.J.Haemat. 1, 64 (1955).

26. MUNDSCHENK,H., J. FISCHER: Über das Verhalten von mit 1-Bromomercuri-2-hydroxypropan (BMHP) beladenen Erythrozyten im Tierversuch. Nucl.Med. 5, 355-368 (1966).

27. NECHELESS,T.F., J.M. WEINSTEIN and G.V.Le ROY: Radioactive sodium chromate for the study of survival of red blood cells. J.Lab.Clin.Med. 42, 358-367 (1953).

28. PRIBILLA, W.,W.ERNST, W.RÖTTGEN: Hämatologische Untersuchungen mit radioaktivem Chrom. Klin.Wschr. 37, 23-31 (1959).

29. RACKER, E.: Glutathione reductase (liver and yeast). Methods in Enzymology Vol.II, 722(1955).

30. SAND, J. und K.A. HOFMANN: Einwirkung von Propylen und Butylen auf Mercurisalze. Ber.Dtsch.chem.Ges.33,1353-1358(1900).

31. SANNWALD, S.: Inaug.Diss., in Vorb.Tübingen

32. SCHLÖSSER,L.L.,D.R.Korst, D.V.CLATANOFF and R..F.SCHILLING: Radioactivity over the spleen and liver following the transfusion of ^{51}Cr-labelled erythrocytes in hemolytic anemia. J.clin.Invest. 36,1470-1485 (1957).

33. SCHWARTZ,K.D.,P.KNOLL, D.HAMANN,M.LOECHEL, B.POTSCHWADEK: Die Scintigraphie der Milz mit Brommerkurhydroxypropan(^{197}Hg-BMHP). Fortschr.Röntgenstr.103,367-376(1956).

34. VEALL and VETTER: Radioisotope techniques in clinical research and diagnosis. Butterworth & Co.London, 1958.

35. WAGNERjr.H.N.,J.G.McAFEE, J.M.WEINER,M.IIO, J.MARTINEZ,W.P.CAINE jr.: The use of Hg-203 labeled Bromomercurihydroxypropan (BMHP) in radioisotope scanning of the spleen. J.Nucl.Med.4, 190 (1963).

36. WAGNER jr.H.N.,J.M.WEINER, J.G.McAFEE, J.MARTINEZ: 1-Mercuri-2-hydroxypropan (MHP). Arch.int.Med. 113,696-701(1964).

37. WALLER, H.D.: Persönl.Mitteilung

38. WINKELMANN J.W.,H.N.WAGNER jr., J.G.McAFEE, J.M.MOZLEY: Visualization of the spleen in man by radioisotope scanning. Radiology 75, 465-466 (1960)..

39. WOLF, F., S. WITTE und G.KLEYENSTEIBER: Der Einfluß cytostatischer Behandlung auf die Erythrozytenlebensdauer. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 66, 1041-1044 (1960).

40. WOLF, F.: Radiochrom in der hämatologischen Diagnostik und Forschung. Folia haemat.N.F.6,173-191(1961).

Herrn Professor Dr.med. R. Bauer, Direktor des Medizinischen Strahleninstituts der Universität Tübingen, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Besonders danke ich meinem Doktorvater Priv. Doz. Dr.med. U. Feine für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Doktorarbeit.

Herrn Professor Dr.med. H.D. Waller, Medizinische Universitätsklinik Tübingen, spreche ich meinen Dank aus für die Möglichkeit der Enzymbestimmungen in seinem Labor, sowie besonders für die zahlreichen Hinweise bei der Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 9. Januar 1942 wurde ich, Ingrid Blendinger, als Tochter des Sparkassenangestellten Heinrich Blendinger und seiner Ehefrau Gertrud, in Mülheim/Ruhr geboren. Nach Besuch der Volksschule trat ich im Herbst 1952 in das Mädchenrealgymnasium der Mozartschule in Würzburg ein, wo ich im Juni 1961 die Reifeprüfung bestand. Im Wintersemester 1962/63 begann ich an der Julius-Maximilianus-Universität Würzburg das Medizinstudium. Im Herbst 1963 legte ich das Vorphysikum, im Frühjahr 1965 das Physikum ab. Im Wintersemester 1965/66 studierte ich an der Universität Wien, vom Sommersemester 1966 ab an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, wo ich im Frühjahr 1969 das Staatsexamen bestand.